



# アブラナ科植物における自家和合性変異系統の遺伝学的解析及び雌性側発現遺伝子群の網羅的解析

著者	大坂 正明
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15944号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/58727">http://hdl.handle.net/10097/58727</a>

博士論文（要約）

アブラナ科植物における自家和合性変異系統の遺伝学的解析及び  
雌性側発現遺伝子群の網羅的解析

平成 25 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生態システム生命科学専攻

大坂 正明

## 序論

アブラナ科植物において受粉は植物生殖における初期の重要なステップである。雄しべから放出された花粉は雌しべ柱頭先端の乳頭細胞で受粉し、受粉後の花粉は初めに自他認識機構の一つである自家不和合性分子機構によって自己か非自己か判断される。非自己花粉と認識された花粉は、乳頭細胞表面上で吸水し、花粉管を発芽・伸長し柱頭組織内へと侵入する。花粉が自他認識・吸水・発芽・伸長といったプロセスを果たすにあたり、柱頭側は自他認識の識別、花粉への水分供給、発芽に必要な養分供給、そして花粉管を柱頭内へ導くための誘導に関わる機能を担っていると推定される。しかし、自家不和合性反応を含めこれらを制御する分子メカニズムについては多くがまだ解明されていない (図 1)。

そこで、本研究では自家不和合性反応の分子機構の解明、並びに受粉分子機構の解明を目的に、自家和合性変異系統を用いた遺伝学的解析及び、アブラナ科植物を用いた組織特異的な網羅的解析を行った。さらに得られた知見を融合することにより自家和合性変異系統の原因遺伝子の探索を行った。

## 第一章

受粉の場である乳頭細胞で機能する様々な分子メカニズムを総合的に理解し、自家不和合性を含めた花粉認識から花粉管誘導に至る一連の受粉分子メカニズムを解明することを目的に乳頭細胞組織特異的な網羅的解析を行った。近年、組織特異的解析として、LM とマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析に関して、イネを材料として報告がある (Suwabe et al. 2008)。しかし、LM と NGS を融合した解析は組織特異的な網羅的解析として多くの報告はない。初めに、LM-NGS 解析法の有用性を明らかにするため、得られた発現遺伝子群について qRT-PCR や *in-situ* hybridization により遺伝子発現の調査を行い、さらに、これまでに報告のあるマイクロアレイ解析データと照合することで、LM-NGS 解析の構築を行った。その結果、無作為に選出した遺伝子に関して、qRT-PCR では乳頭細胞において特異的、あるいは優位に発現していることが明らかになった (図 2)。また、*in-situ* hybridization では、得られた発現遺伝子リスト内のいくつかの遺伝子は乳頭細胞における遺伝子発現が確認された (図 3)。*A.thaliana* 乳頭細胞特異的発現遺伝子リストとこれまでに報告のある花器官全体のマイクロアレイ解析データの比較解析から 6,898 遺伝子 がこれまでに未検出であった乳

乳頭細胞発現遺伝子として取得することができた。さらに、6,898 遺伝子のうち 2,749 (約 40%) の遺伝子が 24,000 遺伝子が登録されている ATH1 genome array gene chip に含まれていなかった (図 4)。これらのことから、LM-RNA-seq これまでのアレイ解析では検出することができなかった遺伝子群を得ることができ、fine scale の組織特異的遺伝子発現解析の有用性が示唆された。

次に、アブラナ科植物に属する、*A.thaliana*, *A.halleri*, *B.rapa* を材料に 3 種を用いた乳頭細胞発現遺伝子の比較解析を行うことにより、乳頭細胞発現遺伝子群の構築と特徴づけを行った。比較解析の結果、3 種で共通して発現している遺伝子は 12,311 種存在し、*A.thaliana*, *A.halleri*, *B.rapa* それぞれで 64%, 71%そして 87%が共通して発現していた (図 5)。それぞれの遺伝子群に関して、GO 解析から受粉に関わると考えられるカテゴリーに属する遺伝子の割合が非常に似通っていた (図 6)。これらのことから、アブラナ科内において共通器官の乳頭細胞では、種を超えて機能する遺伝子が多く存在していることが考えられ、さらには、これらの遺伝子リストには、科内において受粉や乳頭細胞の形態形成に関わる共通した遺伝子が存在していると考えられた。

上記解析により見出された共通発現遺伝子群において、アブラナ科植物の受粉分子機構で共通するメカニズムと考えられる、花粉管の誘導に関して着目した。植物生殖において、RLK の一つである RLCK VII グループの遺伝子に注目して解析したところ、共通発現遺伝子群から 23 の遺伝子が発現していることが明らかになった。それらの中には、近年、報告のある花粉管ガイダンス因子が含まれており、これらの遺伝子に関して、更なる解析を行うことによって、乳頭細胞上での花粉管誘導に関する知見を得ることができ、未解明の柱頭上での花粉管ガイダンス物質の同定に繋がると考えられた。

## 第二章

受粉分子システムにおける自他認識機構の一つである自家不和合性分子機構において、花粉・乳頭細胞間の情報伝達に必要な *S* 遺伝子 (*SRK*, *SP11*)、及び認識以降の雌ずい因子 *ARC1*, *MLPK*, *THL* が単離されたが、認識反応以降の分子メカニズムは明らかになっていない (図 7)。本研究では、自家不和合性分子機構の解明を目指し、本研究室で見出された自家和合性変異系統 2 系統 (*TSC4*, *TSC28*) の遺伝学的解析及び、*TSC28* 系統において詳細な遺伝解析を行った (図 8)。また、これまでに報告のある既

知 SI 関連因子 (*SRK*, *SP11*, *MLPK*, *ARC1*, *THL*) の染色体上の座乗位置を明らかにした。遺伝解析の結果から TSC4, TSC28 の原因遺伝子座は A3, A1 染色体上にそれぞれ座乗することが明らかになり、これまでに同定された既知 SI 関連因子とは異なった位置に座乗することが明らかになった (図 9)。さらに、TSC28 の詳細な遺伝解析により、原因遺伝子が座乗すると考えられる領域を約 1Mb 内に絞り込むことができた。候補領域内には 113 の遺伝子が座上していることを明らかにし、自家不和合性と類似する点がある病原菌の菌糸の侵入に関わる病害応答性遺伝子について注目すると 4 遺伝子が座乗していることが明らかになった。これらの遺伝子の中には、自家不和合性反応に関与する遺伝子が存在することが考えられ、TSC28 系統の更なる詳細な解析が原因遺伝子の同定に繋がり、自家不和合性反応に新たな知見を与えることが期待される。

### 第三章

アブラナ科植物の受粉分子機構を、網羅的遺伝子発現解析、及び古典的な遺伝解析の両面からのアプローチによって解明することを目的とした。上述した知見をもとに、TSC28 系統を材料に、LM-NGS 法を用いて自家不和合性 TSI3 系統と比較解析を行った。遺伝解析による結果から TSC28 の原因遺伝子は A01 染色体上の約 1.01Mb 領域内に座上していると考えられた。LM-NGS 解析の結果から発現レベルで調査した場合、上記領域内には、TSI3 及び TSC28 系統合わせて 55 遺伝子にまで絞り込むことができた。これらの遺伝子において、TSC28 で発現が見られなかった、もしくは発現量が低下していた遺伝子を探索したところ、それぞれ 9 遺伝子存在することを明らかにした (図 10)。近年、植物生殖と病害応答性に関わる遺伝子が共通するとの報告があることから、この報告をもとに候補遺伝子から病害応答性遺伝子の探索を行ったところ TSC28 系統で、一つの遺伝子について TSI3 と比較したところ 20.5 倍差の発現差が生じていることを見出した。乳頭細胞で発現が確認された候補遺伝子は、他器官との発現比較から柱頭特異的に発現していることが明らかになり、新規自家不和合性関連因子の候補遺伝子として考えた。

植物生殖における受粉分子機構は、正常な受精に至るための必要かつ重要なステップである。近年までに、多くの研究者による精力的な植物生殖に関する研究が行われ、受粉機構の現象が徐々に明らかになりつつある。しかし、花粉と柱頭の情報伝達には、

まだまだ多くの謎が含まれている。本研究では、自家不和合性をはじめ、受粉領域である雌性側、乳頭細胞の網羅的解析を行った。本研究により得られた知見が、未だ謎の多い雌雄間コミュニケーションの解明に貢献すること期待する。

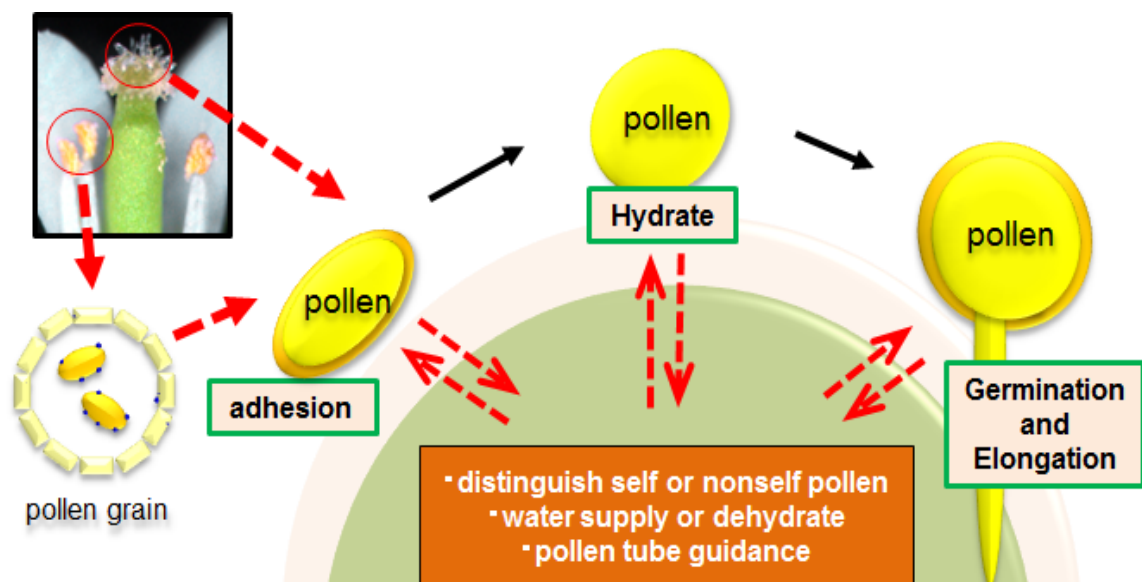


図 1. 受粉分子機構における花粉と柱頭のクロストーク (模式図)

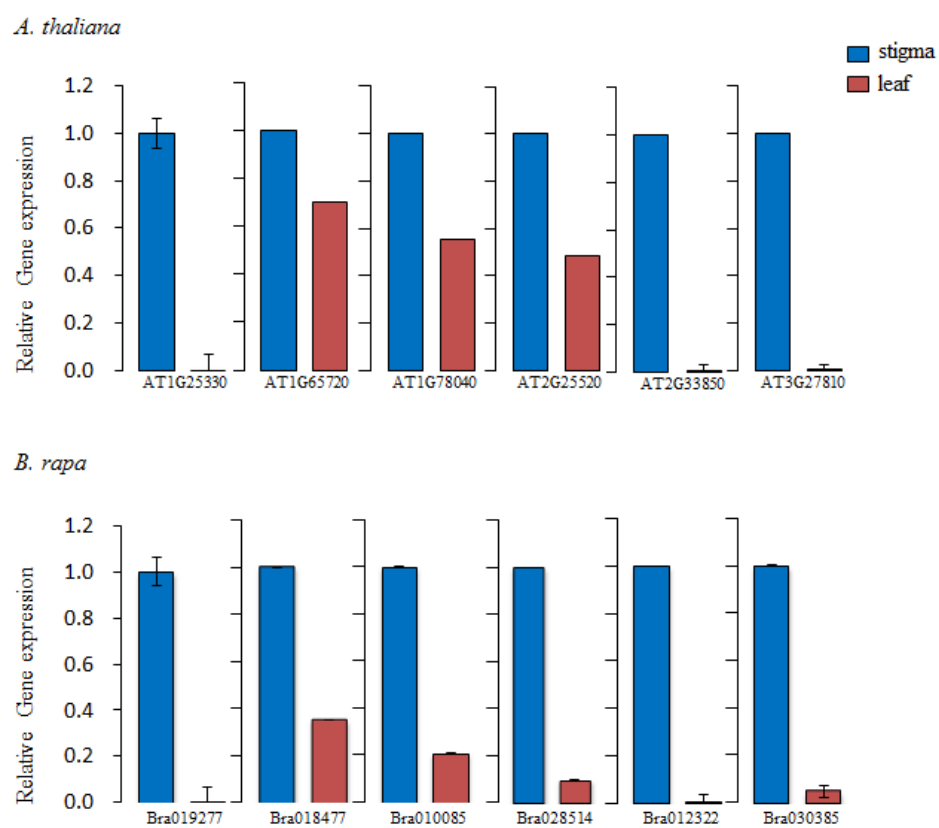


図 2. qRT-PCR による発現解析

*A. thaliana* (上段), *B. rapa* (下段) における各遺伝子の乳頭細胞と葉の発現量比較。  
内在性コントロールには *UBC21* を用いた。



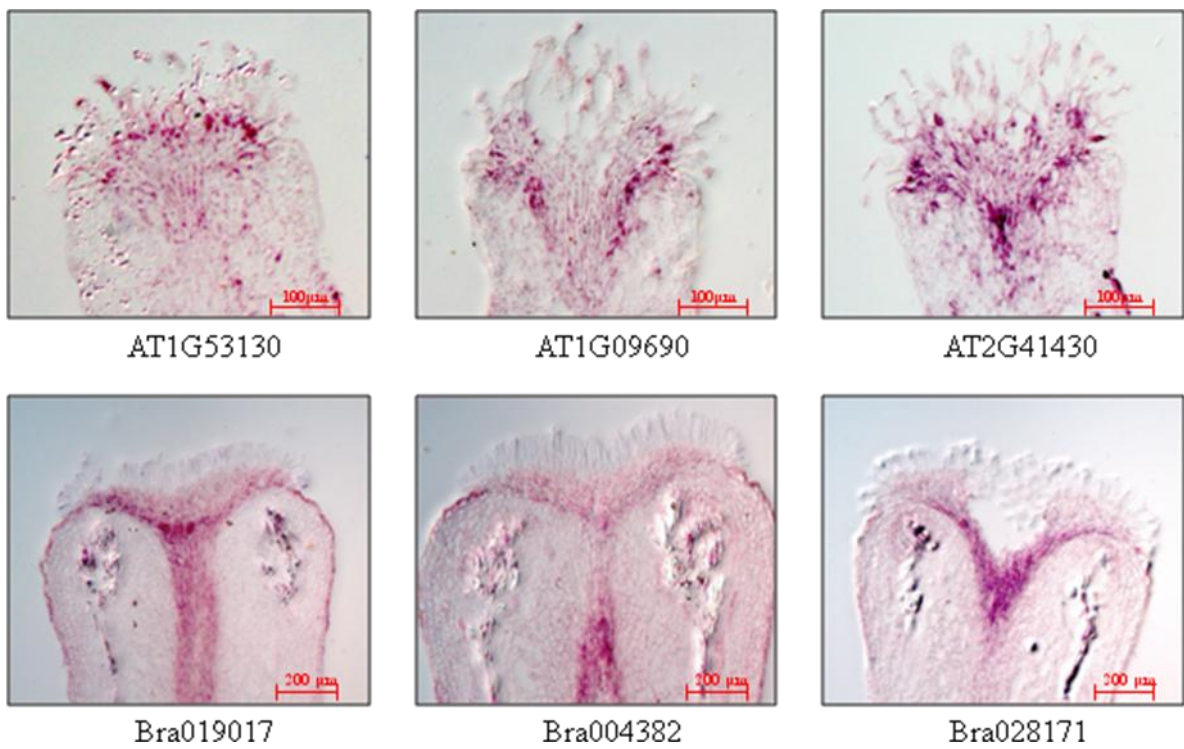


図 3. *In-situ* hybridization による発現解析

*A.thaliana* (上段)及び *B.rapa* (下段) から未受粉の柱頭を用いて切片を作成し、*in-situ* hybridization 解析に用いた。スケールバー＝100μm (上段)、200μm (下段)。

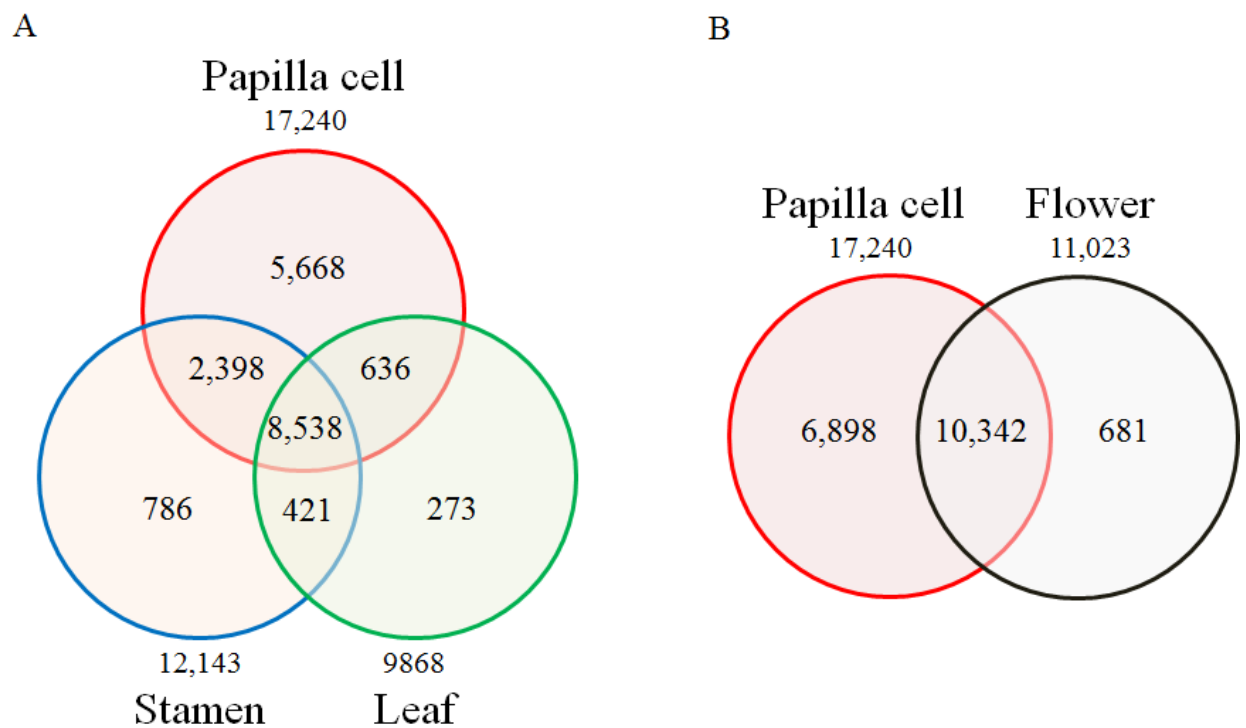


図 4. *A. thaliana* 乳頭細胞発現遺伝子と Schmid et al. (2005)によるマイクロアレイ解析データとの発現遺伝子比較

Schimid et al. (2005) により報告のある(A) 雄ずい、葉器官、(B) 花器官全体におけるマイクロアレイ解析データと *A. thaliana* 乳頭細胞発現遺伝子の比較解析結果。

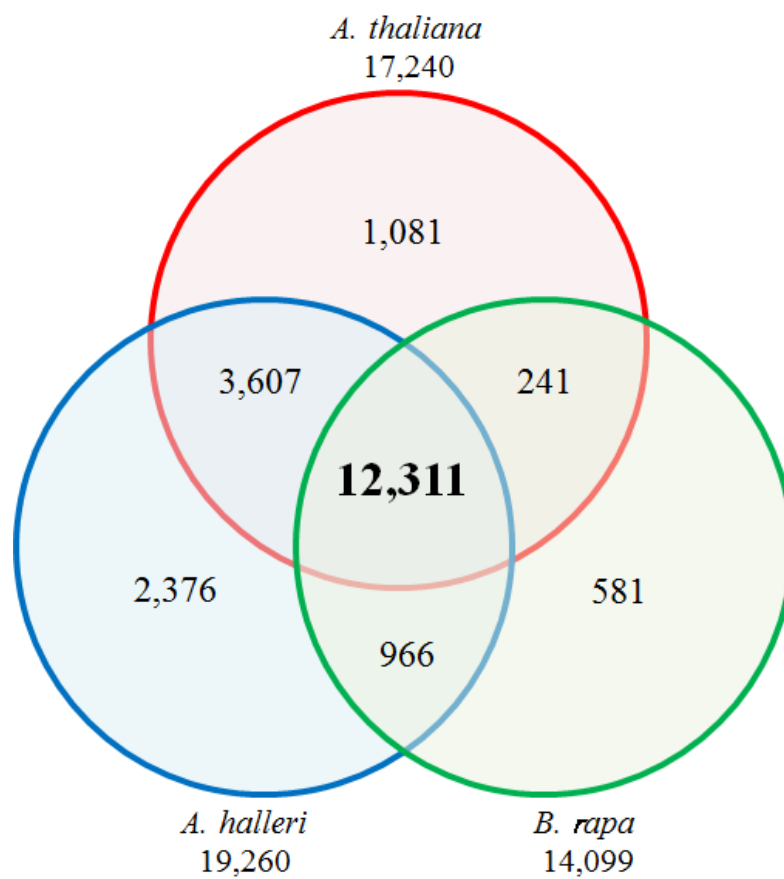


図 5. アブラナ科植物における重複度解析

*B.rapa* の乳頭細胞発現遺伝子は、*A. thaliana* との BLASTX 解析 (threshold=1e-5) によって得られた遺伝子数を示す。

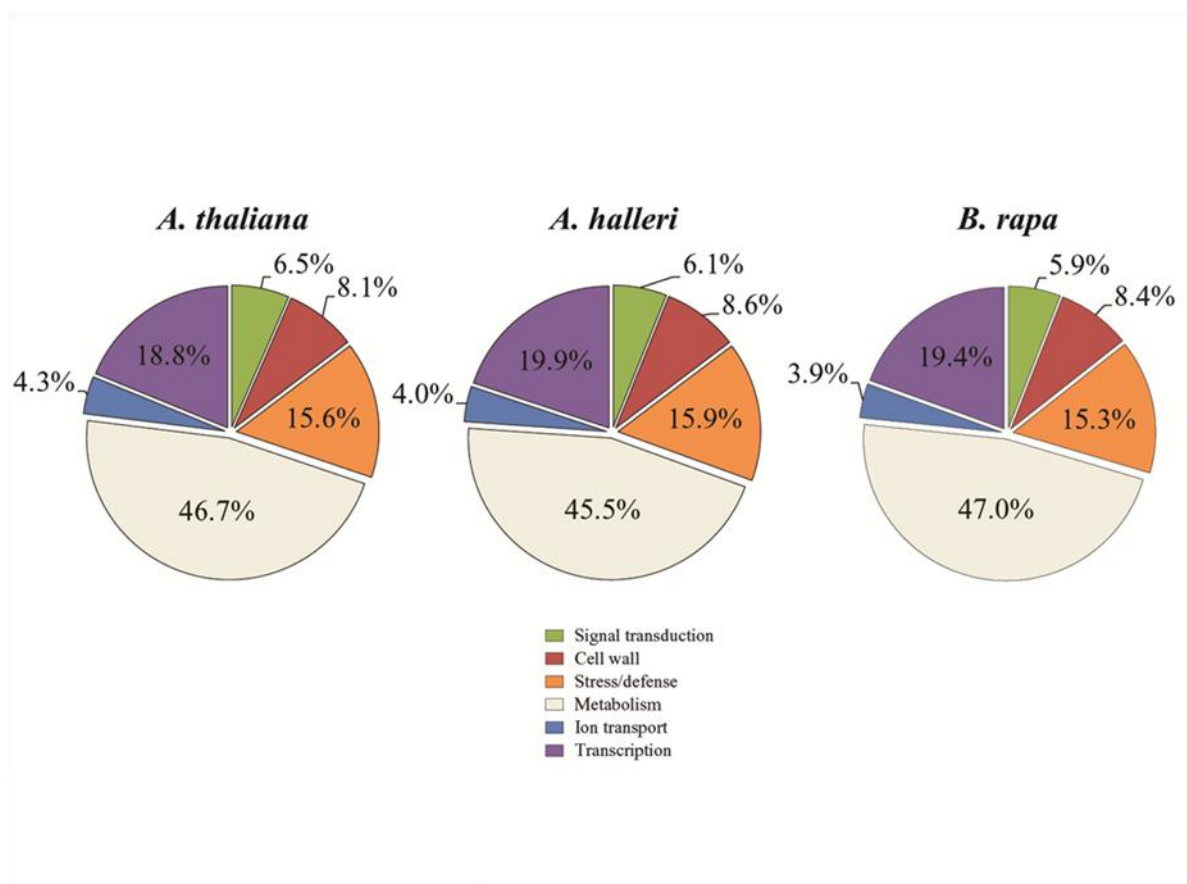


図 6. アブラナ科植物における受粉システム関連 GO カテゴリーの割合

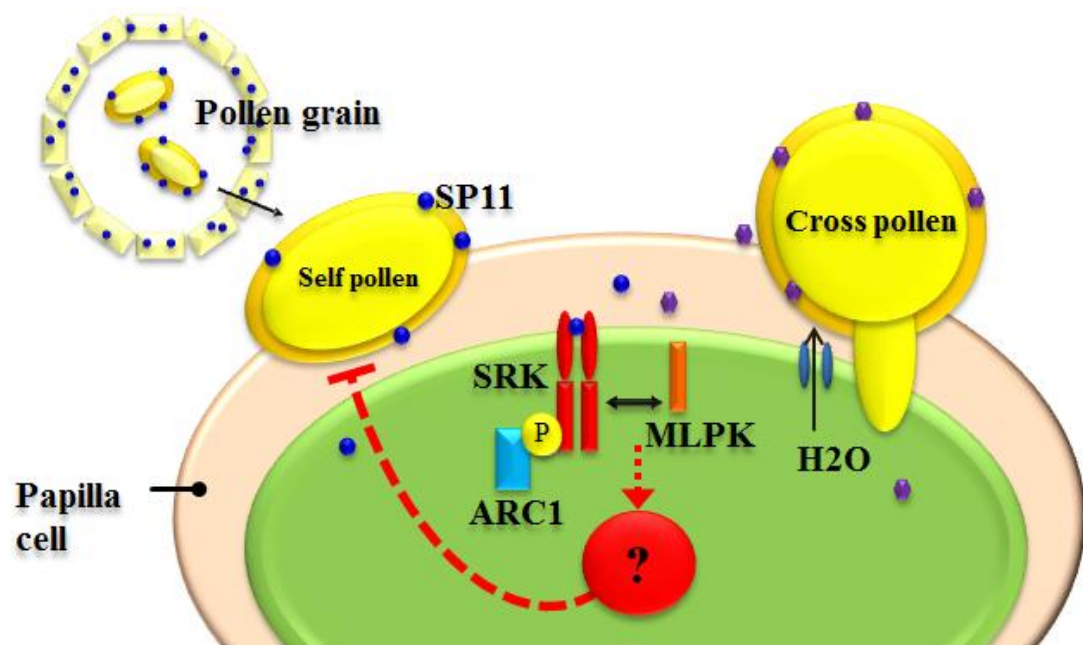


図 7. 自家不和合性分子機構におけるシグナル伝達経路 (模式図)

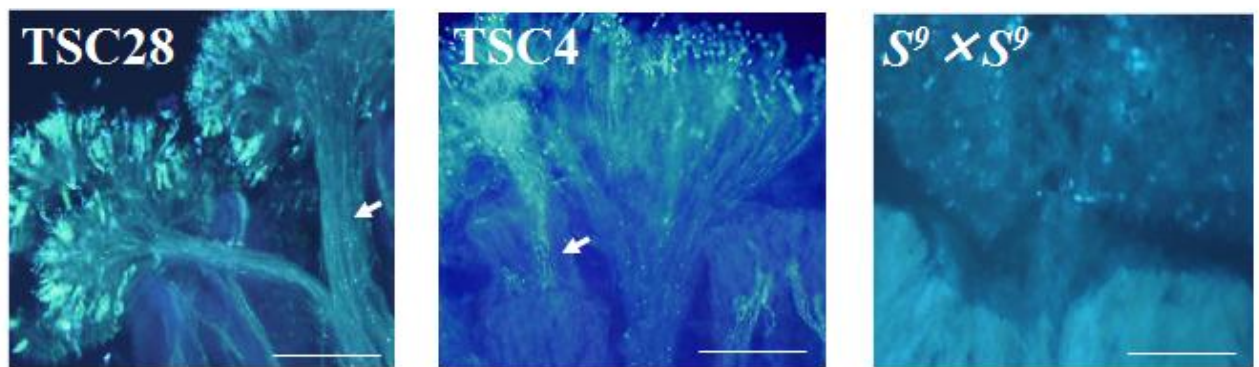


図 8. SC 変異系統及び SI 系統の花粉管伸長観察 (白澤、2007)

SC, SI 系統ともに自家受粉し、一晩放置した後アニリンブルーで染色した。矢印は花粉管を示す。スケールバー=50 $\mu$ m。

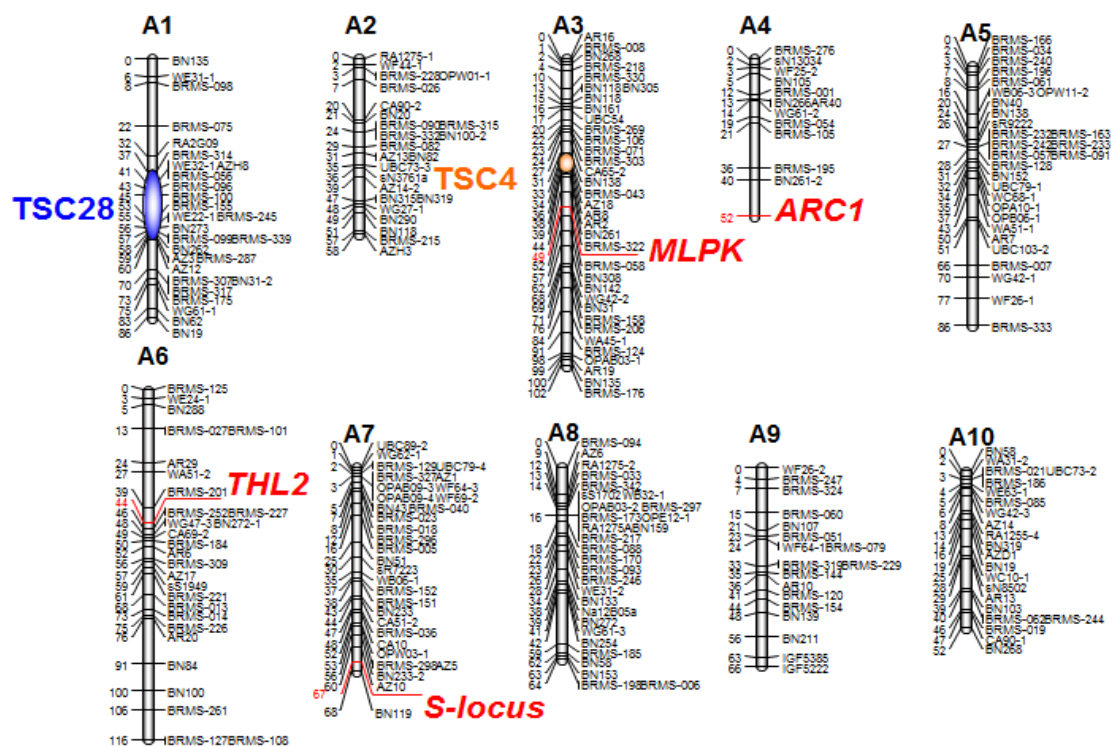


図 9. *B. rapa* 連鎖地図における既知 SI 関連遺伝子と SC 原因遺伝子の座乗位置  
*B. rapa* 全染色体における各因子を赤字で示す。青色領域とオレンジ色領域は、それぞれ TSC4 と TSC28 の変異遺伝子が座乗している領域。

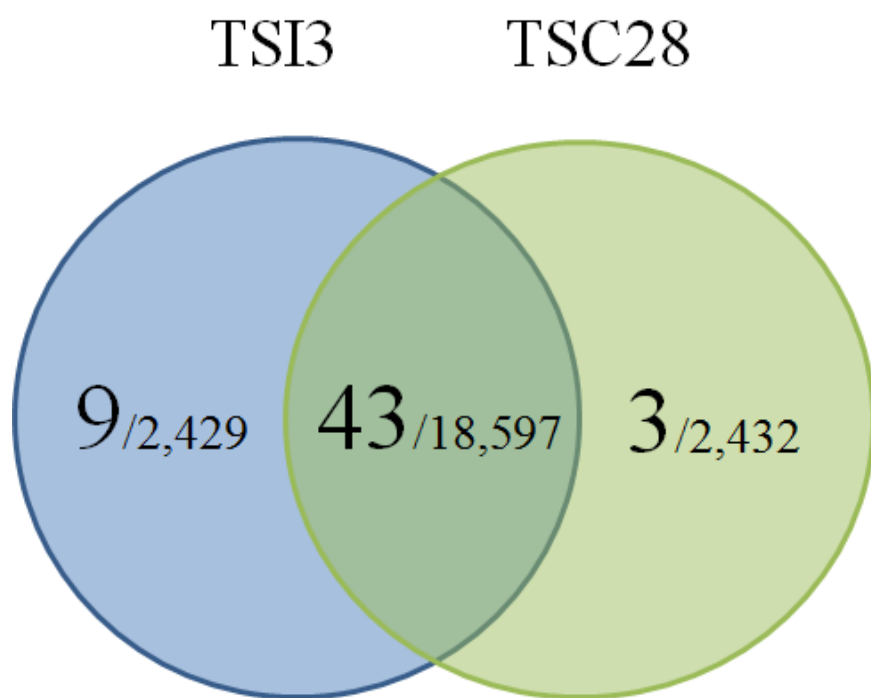


図 10. SI 系統と SC 系統の乳頭細胞発現遺伝子の比較解析

分母は乳頭細胞発現遺伝子総数に対する各系統及び共通遺伝子数。分子は、候補領域内における各系統特異的、共通発現遺伝子数。